

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-173448

(P2002-173448A)

(43)公開日 平成14年6月21日(2002.6.21)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F 1	テマコード(参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
	38/55	A 6 1 P 25/28	4 B 0 2 4
A 6 1 P 25/28		43/00	1 1 1 4 C 0 8 4
	43/00	C 1 2 N 9/99	4 H 0 4 5
C 1 2 N 9/99	1 1 1	G 0 1 N 33/15	Z
		審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 9 頁)	最終頁に統く

(21)出願番号 特願2000-367737(P2000-367737)

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(22)出願日 平成12年12月1日(2000.12.1)

(72)発明者 根來 尚温

大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製  
薬株式会社内

(72)発明者 小島 深一

大阪市此花区春日出中3-1-98 住友製  
薬株式会社内

(74)代理人 100107629

弁理士 中村 敏夫

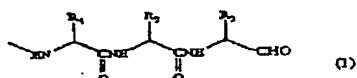
最終頁に統く

(54)【発明の名称】  $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤

(57)【要約】 (修正有)

【課題】  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤の提供。

【解決手段】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。特に酸性プロテアーゼ阻害剤はベプスタチンA又は、式(1)で示される化合物等の提供。



[式中、R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に直鎖又は分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>2</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基又は、カルバモイル基で置換されていてもよい直鎖又は分枝状の低級アルキル基を表す。]

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とする $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項2】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼがベプシンである請求項1記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項3】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤がペプスタチンAである請求項2記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項4】  $\beta$ -セクレターゼがBACE-2のアミノ酸配列の蛋白である、請求項1～3のいずれか記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項5】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

【請求項6】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼがベプシンである請求項5記載の $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

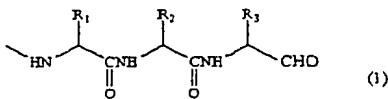
【請求項7】 ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤がペプスタチンAである請求項6記載の $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

【請求項8】  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患がアルツハイマー病である、請求項5～7のいずれかの神経変性疾患治療剤。

【請求項9】 以下の部分構造①、②、③または④を有するペプチドを含有することを特徴とする $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

①一般式(1)のC-末3アミノ酸残基アルデヒド

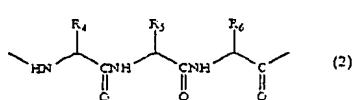
【化1】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に直鎖または分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>2</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基または、カルバモイル基で置換されていてもよい直鎖または分枝状の低級アルキル基を表す。】

②一般式(2)の3アミノ酸残基からなるペプチド

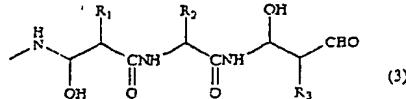
【化2】



【式中、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>はそれぞれ独立に直鎖または分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>5</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基、カルバモイル基あるいはメチルチオ基で置換されていてもよい直鎖または分枝状の低級アルキル基を表す。】

③一般式(3)のC-末3アミノ酸残基アルデヒド

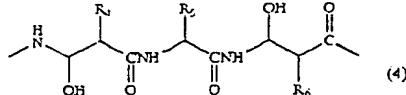
【化3】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に前項と同じ意味を表す。】

④一般式(4)の3アミノ酸残基からなるペプチド

【化4】



【式中、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>はそれぞれ独立に前項と同じ意味を表す。】

【請求項10】 R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>がそれぞれメチル基、n-プロピル基、iso-プロピル基、1-メチルプロピル基、2-メチルプロピル基、n-ブチル基あるいは2-メチルチオエチル基の何れかであり、R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>がメチル基、n-プロピル基、iso-プロピル基、1-メチルプロピル基、2-メチルプロピル基、n-ブチル基、2-カルバモイルエチル基、2-カルボキシエチル基、4-アミノブチル基あるいは2-メチルチオエチル基の何れかである、請求項9記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項11】 R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>がそれぞれn-プロピル基、iso-プロピル基、1-メチルプロピル基、2-メチルプロピル基あるいはn-ブチル基の何れかであり、R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>がメチル基、2-カルバモイルエチル基、4-アミノブチル基あるいは2-メチルチオエチル基の何れかである、請求項9、10記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項12】 請求項9、10または11記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

【請求項13】  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患がアルツハイマー病である、請求項12記載の治療剤。

【請求項14】 請求項9、10、11記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド生成抑制剤。

【請求項15】 以下の工程よりなる $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤のスクリーニング方法。

40 (1) 精製タグ付加可溶性BACE2と、合成蛍光基質MOCAC-SE VNLDLAEFRK(Dnp)RR-NH<sub>2</sub>のバッファー溶液を混合する、  
(2) 次いで被験化合物の溶液を加えて保温する、(3) 培養液の蛍光測定し、アミロイド前駆体の切断活性を測定する。

【請求項16】 ベプスタチンAを基準物質として使用し、ベプスタチンA以上の阻害活性を有する $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を選別することを特徴とする、請求項15記載のスクリーニング方法。

【請求項17】 請求項16記載のスクリーニング方法により得られるベプスタチンA以上の阻害活性を有する

$\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

【請求項18】 請求項17記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド生成抑制剤。

【請求項19】 請求項17記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

【請求項20】  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患がアルツハイマー病である、請求項19記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、 $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤に関する。即ち、本発明は、アルツハイマー病の治療剤等として有用な $\beta$ -アミロイド生成抑制剤に関する。さらに本発明は、 $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年、老人人口の増加に伴い、老人性痴呆症の治療に有効な医薬品の開発が強く望まれている。老人性痴呆症の代表的疾患であるアルツハイマー病は、脳の萎縮、老人斑の沈着および神経原線維の形成を特徴とする変性疾患で、神経細胞の脱落が痴呆症状を引き起こすと考えられている (Alzheimer, A. (1907) Central bl. Nervenheilk. Psychiatr. 30, 177-179)。アルツハイマー病発症の原因について未だ定説はないが、病理組織学的研究により、老人斑が沈着しそれにより神経細胞が脱落し脳の萎縮が生じると考えられている。老人斑の主成分である $\beta$ -アミロイドは細胞毒性作用を有しており、アルツハイマー病における神経細胞死を引き起こしていると考えられている (Yankner, B. et al. Science, 245, 417-420(1989); Cai, X., Gold, T. & Younkin, S. Science, 259, 514-516(1993); Rose, A. Nature Med. 2, 267-269(1996); Scheuner, D. et al. Nature Med. 2, 864-869(1996))。 $\beta$ -アミロイドは39-43残基のアミノ酸からなる凝集しやすいペプチドであり (Glenner, G. G., and Wong, C. W. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885-890)、その前駆体であるアミロイド前駆体蛋白質がプロセシングされることにより、生成される (Haass, C. and Selkoe, D. Cell 75, 1039-1042(1993); Roher, A. E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10836-10840(1993))。アミロイド前駆体蛋白質は膜貫通部位を持つ蛋白質 (Kang, J. et al. Nature, 325, 733-736(1987))で、 $\beta$ アミロイドの17残基目付近 $\alpha$ 部位で切断を受け、N末端を含む分子量約120kDaの断片が細胞外に分泌される (Seubert, P. et al. Nature, 361, 260-262(1993))。一方、 $\beta$ アミロイドはアミロイド前駆体蛋白質のC末端領域に存在し、 $\beta$ アミロイドの両端で切断を受け產生した $\beta$ アミロイドが細胞外に分泌される。アミロイド前駆体蛋白質のプロセシング及び $\beta$ アミロイドの切断にはプロテアーゼが関与していることが推定され、数種類の酵素が候補に挙げ

られてたが、同定されていなかった。ところが最近になり、アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の $\beta$ -サイトを切断する酵素 ( $\beta$ -セクレターゼ) が発見され、クローニングされて、俄に $\beta$ -セクレターゼ性阻害剤の研究が進展した。 $\beta$ -セクレターゼには、アミノ酸配列が異なる2種のサブタイプが存在し、BACE-1 (Vassar, R. et al. Science 286 (5440), 735-741 (1999))、BACE-2 (Yan, R. et al. Nature 402, 533-537 (1999)) と名付けられている。現在、このいずれの酵素を優先的に阻害した方が $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病の治療剤としてよいのかも分かっていない。ごく最近、BACE1を直接阻害する化合物が見出された (Sinha, S. et al. Nature 402, 537-540 (1999); Hong, L. et al. Science 290, 150-153 (2000))。ただし、BACE2に関しては、どのような性質のものが阻害剤として有効であるかについてもほとんど分かっていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明が解決しようとする課題は、有効な $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤またはこれに基づく $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤を提供することである。また、本発明が解決しようとする他の課題は、 $\beta$ -アミロイド生成抑制剤等として有用な新規なアミド化合物を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、鋭意検討の結果、ペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤または後述の式(1)～式(4)で表される化合物が $\beta$ -セクレターゼ活性を有効に阻害することを見出し、本発明を完成した。さらに詳しくは、本発明では、ペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤または本発明の式(1)～式(4)で表される化合物 (3アミノ酸残基を含有するペプチド) が、 $\beta$ -セクレターゼのサブタイプであるBACE-2に関して顕著な活性阻害作用を示すことを見出した。最近の $\beta$ -セクレターゼに関する報告 (Sinha, S. et al. Nature 402, 537-540 (1999); Hong, L. et al. Science 290, 150-153 (2000)) によれば、その活性阻害剤はアルツハイマー病等の $\beta$ -アミロイド沈着性の神経変性疾患の治療剤となることが示されている。一方、これに対して別途の報告 (Bigl, M. et al. Neurosci. Lett., 292, 107-110 (2000)) では、ヒト型APP695 (アミロイド前駆体タンパク) のスウェーデン型変異体を高発現するトランシスジェニックマウス (Tg2576) を用いて次のような知見を報告している。

①加齢に伴いアルツハイマー様の $\beta$ -アミロイドの沈着が見られること。  
②Tg2576の13月齢及び17月齢の脳切片におけるBACE1 mRNAをin situにて検出したところ、様々な部位の神経細胞にはBACE1の発現が認められたが、これまで $\beta$ -セクレターゼとの関連が指摘してきたアストロサイトには

発現が認められなかつたこと。

③アミロイド沈着部位をとりまく領域での発現が多いということではなく、部位特異的発現パターンも $\beta$ -アミロイド沈着に相関していなかつたこと。

以上の事実から、本発明者等は、 $\beta$ -アミロイド沈着にはBACE1以外の $\beta$ -セクレターゼの関与、すなわちBACEの関与が強いものと考えた。即ち、本発明者等は、これらの知見より、BACE-1よりもBACE-2を阻害する方が、より $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患に有効な薬剤が提供できると考えた。本発明者らが見出した阻害剤は、 $\beta$ -セクレターゼのサブタイプであるBACE-2に関して顕著な活性阻害作用を示すことから、本発明の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤は、より有効な $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤であることが示された。

【0005】すなわち本発明の要旨は以下に示す通りである。

(1) ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とする $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(2) ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼがベプシンである上記(1)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(3) ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤がペプスタチンAである上記(2)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(4)  $\beta$ -セクレターゼがBACE-2のアミノ酸配列の蛋白である、上記(1)～(3)のいずれか記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(5) ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

(6) ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼがベプシンである上記(5)記載の $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

(7) ベプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤がペプスタチンAである上記(6)記載の $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

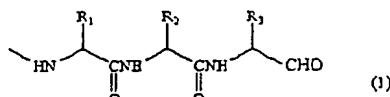
(8)  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患がアルツハイマー病である、上記(5)～(7)のいずれかの神経変性疾患治療剤。

(9) 以下の部分構造①、②、③または④のペプチドを含有することを特徴とする $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

①一般式(1)のC-末3アミノ酸残基アルデヒド

【0006】

【化5】

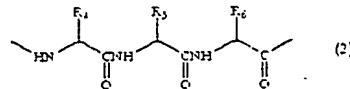


【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に疎水性の直鎖または分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>2</sub>はアミノ基、水

酸基、カルボキシル基またはカルバモイル基で置換されてもよい直鎖または分枝状の低級アルキル基を表す。】

②一般式(2)の3アミノ酸残基からなるペプチド

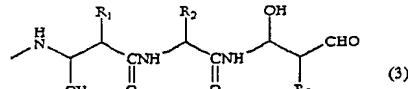
【化6】



【式中、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>はそれぞれ独立に疎水性の直鎖または分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>5</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基、カルバモイル基あるいはメチルチオ基で置換されてもよい直鎖または分枝状の低級アルキル基を表す。】

③一般式(3)のC-末3アミノ酸残基アルデヒド

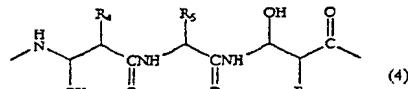
【化7】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に前項と同じ意味を表す。】

④一般式(4)の3アミノ酸残基からなるペプチド

【化8】



【式中、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>はそれぞれ独立に前項と同じ意味を表す。】

(10) R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>がそれぞれメチル基、 $\alpha$ -ブロビル基、iso-ブロビル基、1-メチルブロビル基、2-メチルブロビル基、 $\alpha$ -ブチル基あるいは2-メチルチオエチル基の何れかであり、R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>がメチル基、 $\alpha$ -ブロビル基、iso-ブロビル基、1-メチルブロビル基、2-メチルブロビル基、 $\alpha$ -ブチル基、2-カルバモイルエチル基、2-カルボキシエチル基、4-アミノブチル基あるいは2-メチルチオエチル基の何れかである、上記(9)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(11) R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>がそれぞれ $\alpha$ -ブロビル基、iso-ブロビル基、1-メチルブロビル基、2-メチルブロビル基あるいは $\alpha$ -ブチル基の何れかであり、R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>がメチル基、2-カルバモイルエチル基、4-アミノブチル基あるいは2-メチルチオエチル基の何れかである、上記(9)、(10)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(12) 上記(9)～(11)記載の化合物で、かつプロテアソーム阻害活性を有する化合物を有効成分とする $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(13) 上記(9)～(12)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

(14)  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患がアルツハイマー病である、上記(13)記載の治療剤。

(15) 上記(9)～(12)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド生成抑制剤。

(16) 下の工程よりなる $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤のスクリーニング方法。

(1) 精製タグ付加可溶性BACE2を使用し、(2)合成蛍光基質MOCAc-SEVNLDLAEFRK(Dnp)RR-NH2のバッファー溶液を混合し、次いで被験化合物の溶液を加えて保温する、(3)培養液の蛍光測定し、アミロイド前駆体の切断活性を測定する。

(17) ベプスタチンAを基準物質として使用し、ベプスタチンA以上の阻害活性を有する $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を選別することを特徴とする、上記(16)載のスクリーニング方法。

(18) 上記(16)及び(17)載のスクリーニング方法により得られるベプスタチンA以上の阻害活性を有する $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤。

(19) 上記(18)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド生成抑制剤。

(20) 上記(18)記載の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤。

(21)  $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患がアルツハイマー病である、上記(20)記載の治療剤。

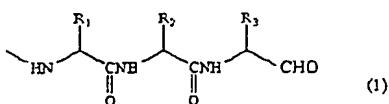
#### 【0007】

【発明の実施形態】本発明の第1態様は、ペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤または後述の式(1)～式(4)で表される化合物を有効成分とする $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤に関するものである。本発明における $\beta$ -セクレターゼには、BACE-1とBACE-2の2つのサブタイプが存在し、それぞれの塩基配列、アミノ酸配列は報告され公知となっている(Vassar, R. et al. Science 286 (5440), 735-741 (1999))、BACE-2 (Yan, R. et al. Nature 402, 533-537 (1999))。本発明におけるペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼとは、例えば、ペプシン、カテーテンD、レニン等を挙げることができる。好ましくは、ペプシンを挙げることができる。本発明におけるペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤とは、該酸性プロテアーゼに阻害活性を示す化合物である。あるいは、以下の部分ペプチドを含有する化合物であり、プロテアーソーム阻害活性を有することが好ましい。

①一般式(1)のC-末3アミノ酸残基アルデヒド

#### 【0008】

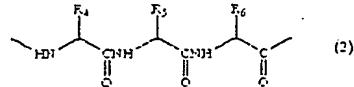
##### 【化9】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に直鎖または分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>2</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基、カルバモイル基で置換されていてもよい直鎖または分枝状の低級アルキル基を表す。】

②一般式(2)の3アミノ酸残基からなるペプチド

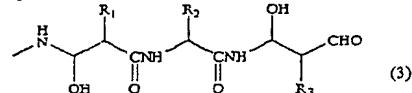
##### 【化10】



【式中、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>はそれぞれ独立に疎水性の直鎖または分枝状の低級アルキル基を表し、R<sub>5</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基、カルバモイル基あるいはメチルチオ基で置換されていてもよい直鎖または分枝状の低級アルキル基を表す。】

③一般式(3)のC-末3アミノ酸残基アルデヒド

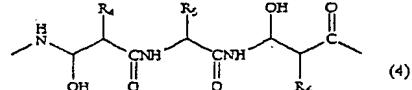
##### 【化11】



【式中、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>はそれぞれ独立に前項と同じ意味を表す。】

④一般式(4)の3アミノ酸残基からなるペプチド

##### 【化12】



【式中、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>はそれぞれ独立に前項と同じ意味を表す。】

本発明のR<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>は、疎水性の直鎖または分枝状の炭素数1～8の低級アルキル基を表し、例えば、メチル基、エチル基、n-ブロビル基、iso-ブロビル基、1-メチルブロビル基、2-メチルブロビル基、n-ブチル基、n-ベンチル基、n-ヘキシル基あるいは2-メチルチオエチル基を挙げることができる。好ましくはR<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>6</sub>が、n-ブロビル基、iso-ブロビル基、1-メチルブロビル基、2-メチルブロビル基あるいはn-ブチル基を挙げができる。本発明のR<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>はアミノ基、水酸基、カルボキシル基、カルバモイル基で置換されていてもよい直鎖または分枝状の炭素数1～8の低級アルキル基を表し、例えば、メチル基、n-ブロビル基、iso-ブロビル基、1-メチルブロビル基、2-メチルブロビル基、n-ブチル基、2-カルバモイルエチル基、2-カルボキシエチル基、4-アミノブチル基あるいは2-メチルチオエチル基を挙げができる。R<sub>2</sub>、R<sub>5</sub>として好ましいものは、メチル基、2-カルバモイルエチル基、4-アミノブチル基あるいは2-メチルチオエチル基を挙げができる。さらに詳しく述べて、ペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤として、例えばベプスタチンAおよびヒドロキシペプスタチン等を挙げること

ができる。好ましくは、ペプチドAを挙げができる。疎水性アミノ酸3残基以上からなるペプチド性阻害剤とは、例えばLLL (MG-132)、LLnV (MG-115)等を挙げができる。好ましくは、LLL (MG-132)を挙げができる。好ましくは、ペプチドA、ヒドロキシペプチド等を挙げができる。より好ましくは、ペプチドAを挙げができる。なお、上記で使用される阻害剤ペプチドの略号は以下の内容を表すものである。

【0009】 [阻害剤略記]

DMQD : Ac-Asp-Met-Gln-Asp-H (aldehyde)

LEHD : Ac-Leu-Glu-His-Asp-H (aldehyde)

LL : Z-Leu-Leu-H (aldehyde)

LLL : Z-Leu-Leu-Leu-H (aldehyde)

LLnV : Z-Leu-Leu-Nva-H (aldehyde)

【0010】 本発明の第2態様は、ペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とする $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤に関するものである。本発明の $\beta$ -アミロイド沈着性神経変性疾患としては、例えば家族性アルツハイマー病および弧発性アルツハイマー病等を挙げができる。

【0011】 本発明の第3態様は、 $\beta$ -セクレターゼの活性阻害剤に関するものである。本発明の $\beta$ -セクレターゼとは、BACE-1およびBACE-2の二つのサブタイプのことを表す (Science, 286 (5440), 735-741 (1999)、Nature 402, 533-537 (1999))。本発明の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤とは、上記BACE-1およびBACE-2の二つのサブタイプの酵素を阻害するものを表す。好ましい $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤とは、サブタイプBACE-2をより選択的に阻害するもの等が挙げられる。なお、本発明の $\beta$ -セクレターゼ阻害剤とは、サブタイプBACE-2を阻害していればそれでよく、サブタイプBACE-1を阻害しないものを排除するものではない。

【0012】 本発明の第4態様は、 $\beta$ -セクレターゼの活性阻害剤のスクリーニング方法に関するものである。本発明のスクリーニング方法において、タグ付加可溶性BACE2とは、例えば、BACE2の膜貫通ドメイン以降の代わりに6xHisタグやFcタグを有する融合タンパクを表す。本発明のスクリーニング方法では、合成蛍光基質MOCAC-SEVNLDLAEFRK(Dnp)RR-NH<sub>2</sub>溶液と精製タグ付加可溶性BACE2溶液を混合し、次いで被験化合物の溶液を加えて保温するが、その反応溶液、濃度、温度等に関しては適宜通常の酵素反応実験における条件を選択することができる。例えば、スクリーニングの反応液組成は0.2M NaOAc-HOAc buffer (pH4.6)、30  $\mu$ M 蛍光合成基質溶液、酵素液量最大40% (v/v)を選択することができ、反応温度は37°Cで14~18時間反応させることができ。本発明における反応の進捗については、培養液の蛍光測定により観測することができ、適宜市販の蛍光測定器を使用することができる。例えば、フルオロスキャンIIを使用し、測定

条件としてはex=320nm、em=405nmで測定を行うことができる。これにより $\beta$ -セクレターゼのアミロイド前駆体切断活性を測定することができる。

【0013】 本発明の一般式 (1) ~ (4) で表される $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤は、それぞれのアミノ酸残基に対応するものとして、天然のアミノ酸あるいは合成アミノ酸を使用することができる。合成アミノ酸として、非天然型のアミノ酸は適宜公知の方法で得ることができ、例えば、第4版実験化学講座22「有機合成I V」(丸善)に準じて製造することができる。更には、これらの文献、あるいは新生化学実験講座1「タンパク質V」(合成及び発現) (東京化学同人)に記載のペプチド合成の方法に準じて製造することができる。

【0014】 本発明の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤は、酸性プロテアーゼ阻害剤を有効量含有する製剤であり、以下のような導入方法、導入形態および導入量で使用され得る。本発明の $\beta$ -セクレターゼ活性阻害剤は、経口、非経口で患者に投与される。非経口投与としては、静脈注射による投与、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与、坐薬としての投与などが行える。本発明のタンパク製剤は、上記の投与方法に依存して、種々の単位投与形態で投与することができる。例えば静脈投与のためには、本発明のタンパク質を、医薬として許容され得る担体、好ましくは水性担体の中に溶解または懸濁させて用いることができる。水性担体としては、例えば、水、緩衝化水、0.4%の生理的食塩水などを使用することができる。このようにして作製された水溶液は、そのまま包装するか、あるいは凍結乾燥することができ、凍結乾燥した調製物は投与前に無菌の水溶液に溶解させて使用することができる。以上の調製物は、医薬として許容される補助剤、例えば、pH調節剤あるいは緩衝剤、張度調節剤、浸潤剤などを、より具体的には、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエートなどを含有することができる。経口投与のためには、本発明のタンパク質を、粉末、錠剤、ビル、カプセル剤及びシロップ剤の単位投与形態にして用いることができる。皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与のためには、本発明のタンパク質を水性または油性担体の中に溶解または懸濁させて用いることができる。あるいは、コラーゲン等の生体親和性の材料を用いて、徐放性製剤として投与することもできる。製剤中のタンパク質の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常は0.001~100mg、好ましくは0.1~10mgである。

【0015】

【実施例】 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

## 【0016】実施例1

## タグ付加可溶性BACE2の製造

## 1)発現プラスミドpMEBACE2の構築

ヒトBACE2 cDNA全長を含むプラスミドGenBank No. AI274802はNCBIより購入した。SalI及びNotI消化により切り出したcDNAインサート全長を、pUC19をベースとしてSRαプロモーター、EcoRI-XbaI-NotIリンカー及びSV40のpoly(A)付加配列を有する発現ベクターのXbaI-NotI間に挿入した。得られたプラスミドをpMEBACE2と命名した。

## 2)発現プラスミドpMEBACE2Kの構築

BACE2の発現効率を上昇させるために、BACE2にコザックのコンセンサス配列を導入した。まず、プライマー 5'-TCT GAA TTC CGC CAC CAT GGG CGC ACT GGC CCCGGC GC T-3' および 5'-GCC CTT GGA GCG GTA TG-3' を用いてpMEBACE2を鋳型としてPCRを行って得た断片をEcoRIとBstXIで消化した後に電気泳動ゲルより約240bpのバンドを切り出し断片1とした。続いて、pMEBACE2をEcoRIおよびBstXIで消化して得たベクターを含む大断片2、およびpMEBACE2をBstXIで消化して得た約1kbの断片3を、いずれも電気泳動ゲルからの切り出しにより調製した。断片1、2及び3を結合することにより、BACE2の翻訳開始部位上流をコザックのコンセンサス配列に置換したpMEBACE2Kを得た。PCRにより目的とする変異が導入されたこと、および目的外の変異が起きていないことをシーケンシングにより確認した。

## 3)発現プラスミドpMEBACE2K\_TMDの構築

合成オリゴヌクレオチド5'-GTG GAT TGT GTC CTA TCA TCA TCA CCA TCA CCA TTG AGT GC-3' 及び 5'-GGC CGC ACT CAA TGG TGA TGG TGA TGA TAG GAC ACAATC CAC AAA-3' を、5'末端をリン酸化した後にアニーリングし、pMEBACE2KをPf1MIおよびNotIで消化して得た大断片と連結した。このようにして得たプラスミドは、BACE2の膜貫通ドメイン以降の代わりに6xHisタグを有する融合タンパクをコードする。本プラスミドをpMEBACE2K\_TMDと命名した。

## 4)発現プラスミドpMEBACE2K\_Fcの構築

pBSK-hIgGFc-linker+はヒトIgGのFcドメイン (IgG-Fcのsequence : GENBANK ACCESSION, Y14735, 756塩基目-1462塩基目) を含み、その5'側にEcoRI-HindIII-SphI-XbaIのマルチクローニングサイトを、3'側にNotI-SacIのサイトを有するプラスミドである。プライマー5'-CGC CAA CTT CTT GGC CAT GGT AGA-3' 及び 5'-TAC GCT CG A CGC ATA GGA CAC AAT CCA CAA AAT GGG CTC-3' を用いてpMEBACE2を鋳型としてPCRを行い得られた断片をEcoRI及びXbaIで消化して得た断片を、pBSK-hIgGFc-linker+のマルチクローニングサイト中のEcoRI-XbaI間に挿入した。PCRにより目的とする変異が導入されたこと、および目的外の変異が起きていないことをシーケンシングにより確認した。得られたプラスミドをPf1MI及びNotIで消化することにより約750bpの断片を得、pMEBACE2K 50

をPf1MIおよびNotIで消化して得た大断片と連結した。

このようにして得たプラスミドはBACE2の膜貫通ドメイン以降の代わりにFcタグを有する融合タンパクをコードする。本プラスミドをpMEBACE2K\_Fcと命名した。

## 5)タグ付加可溶性BACE2の発現および一段階精製

得られたタグ付加可溶性BACE2をコードするプラスミドをCOS1細胞に導入することにより一過性発現させた。COS1細胞を150mmプレートに撒きこみ、50~70%コンフレントに達した時点でFuGene (ベーリンガーマンハイム) を用いてプラスミドを導入した。導入条件はFuGeneの取扱説明書にしたがった。導入後1日目に無血清培地に交換し、そのまま培養を継続した。7日目ないし8日目に培養上清を回収し、3000回転、10分間遠心後、-20°Cにて凍結保存した。6xHisタグ付加品の一段階精製についてはHiTrap (アマシヤムファルマシア) を利用し、メーカーの取扱説明書の記載にしたがって、40mM、100mM 及び500mMイミダゾールにて溶出し、1mlづつフラクションを行った。Fcタグ付加品一段階精製についてはHiTrap Protein A (同) を利用し、メーカーの取扱説明書の記載にしたがって、0.2Mクエン酸-りん酸緩衝液 (pH3.6) により溶出し、1mlづつフラクションを行った。

## 【0017】実施例2

## タグ付加可溶性BACE2のアミロイド前駆体切断活性測定

アミロイド前駆体として合成蛍光基質MOCAc-SEVNLDAEFRK(Dnp)RR-NH2を使用した。本合成蛍光基質はペプチド研究所より購入し、メーカーの取扱説明書の記載にしたがった。反応液組成は0.2M NaOAc-HOAc buffer (pH4.6)、30μM蛍光合成基質溶液、酵素液量最大40%(v/v)とした。37°Cで14~18時間反応後、フルオロスキャンIIにてex=320nm、em=405nmで蛍光測定を行った。結果を以下に示す。

1回目： [サンプル名]	[蛍光強度]
6xHis精製品 フラクション2	121.9
フラクション5	46.7
Fcタグ精製品 フラクション2	215.6
フラクション3	143.1
ネガティブコントロール	25.7
2回目： [サンプル名]	[蛍光強度]
6xHis精製品 フラクション2	112.9
フラクション5	44.48
Mock導入培養上清の6xHis精製品	
フラクション2	42.71
フラクション3	43.07
Fcタグ精製品 フラクション2	77.38
フラクション3	26.07
Mock導入培養上清のFc精製品	
フラクション2	21.44
フラクション3	20.17
ネガティブコントロール	26.66

## 【0018】実施例3

タグ付加可溶性BACE2に対するペプスタチンAのβセクレターゼ阻害作用

実施例2と同様の反応系にてペプスタチンAの阻害作用を検討した。50 μM及び5 μM ペプスタチンAは1mMメタノール溶液を調製し、5%及び0.5%(v/v)にて反応液に添加した。比較のため5%及び0.5%メタノールのみの阻害効果も検討した。反応は3連で行った。ペプスタチンAは50 μMで明らかな阻害活性を、5 μMでも約30%の阻害活性を示した。結果を図1に示す。P10-P4'statVも1 μMで明らかなBACE2阻害活性を示したが、これはSinhaら (Sinha, S. et al., Nature, 402, 537-540(1999)) がBACE1をIC50=約30nMで阻害することを報告している基質アナログである。同文献ではペプスタチンはBACE1を阻害しないことが報告されている。以上の結果から、ペプスタチンAはBACE1を阻害せず、選択的にBACE2を阻害することが示された。また、公知のβセクレターゼの阻害剤であるP10-P4'statVはBACE2を阻害するものの、より選択的にBACE1を阻害するものであることが示された。

## 【0019】実施例4

タグ付加可溶性BACE2に対する種々の酵素阻害剤のβセクレターゼ活性阻害作用

実施例3と同様の反応系にて種々の酵素阻害剤の阻害作用を検討した。各種酵素阻害剤の50 μM及び5 μMについては1 mM溶液をDMSOにて調製した。ただし、Pepstatinはメタノールにて、PhosphoramidoneはdH<sub>2</sub>Oにて1mM溶液を調製した。各々、5%及び0.5%(v/v)にて反応液に添加した。0.5 μMについては1mM溶液をdH<sub>2</sub>Oにて1/10希釈し、0.5%(v/v)にて反応液に添加した。LLLa1 (MG-132)、LLnVal (MG-115) についてはペプスタチンAと同等以上の阻害効果を認めた。なお、BACE1に対して同様の検討を行った結果、これらの阻害剤はいずれもBACE1に対して阻害効果を示さなかった。結果を図2に示す。

## 【0020】実施例5

タグ付加可溶性BACE2に対する他の酸性プロテアーゼ阻害剤のβセクレターゼ活性阻害作用とその再現性 (LLL (MG-132)、LLnV (MG-115)、HIV protease inhibitorの阻害効果)

実施例4と同様にしてLLL、LLnV及び酸性プロテアーゼ阻害剤であるHIV protease inhibitorのBACE2阻害効果を検討した。HIV protease inhibitorはDMSOにて1mM溶液とした。反応は3連で行った。その結果、以下に示すように、HIV protease inhibitorは阻害作用を示さなかったが、LLL、LLnVについては阻害効果の再現性を確認した。結果を図3に示す。以上の結果より、ペプスタチンA、LLL及びLLnVがBACE2活性を阻害することが明らかとなった。

## 【0021】

【発明の効果】本発明により、ペプシン・ファミリーの酸性プロテアーゼ阻害剤を有効成分とするβ-セレクターゼ活性阻害剤が提供される。特に、本発明のβ-セレクターゼ活性阻害剤はBACE-2の活性阻害剤として有効であり、優れたβ-アミロイド沈着性神経変性疾患治療剤として有用である。

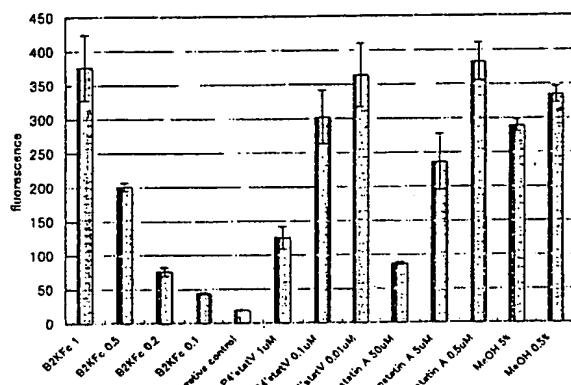
## 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3における可溶化BACE2のアミロイド前駆体合成蛍光基質切断に対する阻害剤の効果を示すグラフである。

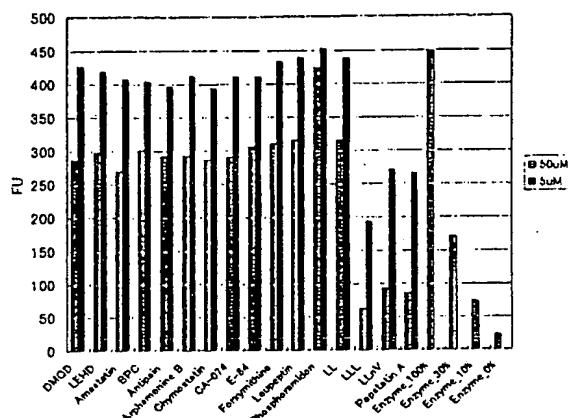
【図2】実施例4におけるタグ付加可溶性BACE2に対する種々の酵素阻害剤のβセクレターゼ活性阻害作用を示すグラフである。

【図3】実施例5におけるLLL、LLnV及び酸性プロテアーゼ阻害剤であるHIV protease inhibitorのBACE2阻害効果を示すグラフである。

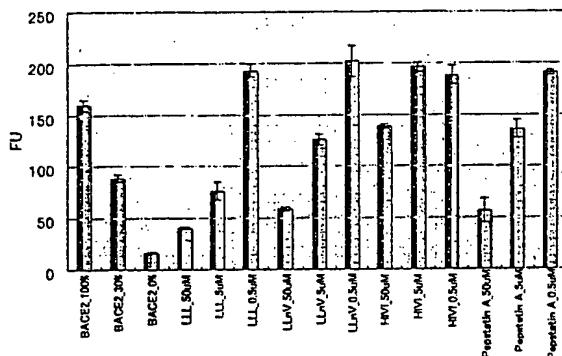
【図1】



[図2]



[図3]



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7  
C 1 2 N 15/09  
G 0 1 N 33/15  
33/50  
33/53  
// C 0 7 K 5/027

## 識別記号

F I	
G 0 1 N	33/50
	33/53
C 0 7 K	5/02
A 6 1 K	37/64
C 1 2 N	15/00

### テーマコード (参考)

F ターム(参考) 2G045 AA35 BB10 BB41 BB46 BB48  
BB51 DA77 FB01 FB02 GC15  
4B024 AA01 BA80 CA01 GA11  
4C084 AA01 AA02 AA07 AA17 BA01  
BA08 BA10 BA14 BA15 BA31  
DC38 MA01 NA14 ZA162  
ZC202  
4H045 AA10 BA12 BA13 CA11 DA55  
EA20 EA28 FA74